



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/86</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/44475</b> (43) Date de publication internationale: 27 novembre 1997 (27.11.97)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00882</p> <p>(22) Date de dépôt international: 20 mai 1997 (20.05.97)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/06213 20 mai 1996 (20.05.96) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LUSKY, Monika [DE/DE]; Kappellenweg 18, D-07910 Freiburg (DE). LEROY, Pierre [FR/FR]; 4, rue de Dentelles, F-67000 Strasbourg (FR). MEHTALI, Majid [FR/FR]; 16, impasse de Reims, F-67400 Illkirch Graffenstaden (FR).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: ADENOVIRUS VECTORS FOR GENE THERAPY</p> <p>(54) Titre: VECTEURS ADENOVIRAUX POUR LA THERAPIE GENIQUE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention features a novel adenovirus vector for minimising the problem of formation of viral particles capable of replication during its propagation in a complementation cell. It is characterised in that at least part of the sequences equally present in the complementation cell is located in a site different from the natural position in the parental adenovirus genome. It also features a host cell and an infectious viral particle containing said vector. Finally, it features a pharmaceutical composition containing same and the therapeutic use thereof.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne un nouveau vecteur adénoviral destiné à minimiser le problème de formation de particules virales compétentes pour la réplication lors de sa propagation dans une cellule de complémentation. Il est caractérisé en ce qu'une partie au moins des séquences également présentes dans la cellule de complémentation est localisée à un endroit différent de son positionnement naturel dans le génome adénoviral parental. Elle a également pour objet une cellule hôte et une particule virale infectieuse le contenant. Enfin, elle concerne une composition pharmaceutique les contenant et leur usage thérapeutique.</p>		

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun		République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KR		PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

## VECTEURS ADENOVIRAUX POUR LA THERAPIE GENIQUE

5

La présente invention concerne en premier lieu de nouveaux vecteurs adénoviraux destinés au transfert de gènes d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte permettant de minimiser le problème de formation de virus réplicatifs lors de leur propagation dans une cellule de complémentation. Elle a également pour objet les cellules hôtes et particules virales infectieuses contenant ces nouveaux vecteurs ainsi qu'une méthode pour préparer ces dernières. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

La possibilité de traiter les maladies humaines par thérapie génique est passée en quelques années du stade des considérations théoriques à celui des applications cliniques. La grande majorité des protocoles décrits jusqu'à présent met en oeuvre des vecteurs viraux pour transférer et exprimer le gène thérapeutique dans les cellules à traiter. A ce jour, les vecteurs rétroviraux sont parmi les plus utilisés du fait de la simplicité de leur génome. Cependant, outre leur capacité restreinte de clonage, ils présentent deux inconvénients majeurs qui limitent leur utilisation systématique : d'une part, ils infectent majoritairement les cellules en division et d'autre part, du fait de leur intégration au hasard dans le génome de la cellule hôte, le risque de mutagénèse insertionnelle n'est pas négligeable. C'est pourquoi, de nombreuses équipes scientifiques se sont attachées à développer d'autres vecteurs de thérapie génique.

A cet égard, les adénovirus offrent plusieurs avantages qui en font des vecteurs de choix pour une grande variété d'applications. En effet, ils infectent de nombreux types cellulaires, sont non-intégratifs, peu pathogènes et peuvent se répliquer dans les cellules en division ou quiescentes. A titre indicatif, leur génome est constitué d'une molécule d'ADN linéaire et bicaténaire d'environ

- 2 -

36 kb portant plus d'une trentaine de gènes, à la fois des gènes précoces nécessaires à la replication virale et des gènes tardifs de structure (voir Figure 1). Les gènes précoces sont répartis en 4 régions dispersées dans le génome adénoviral (E1 à E4 ; E pour early signifiant précoce en anglais). Elles  
5 comportent 6 unités transcriptionnelles qui possèdent leurs propres promoteurs, respectivement E1A, E1B, E2B, E2A, E3 et E4 lorsque l'on parcourt le génome adénoviral dans le sens 5' vers 3'. Les régions E1, E2 et E4 sont essentielles à la replication virale alors que la région E3 impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire anti-adénovirus chez l'hôte ne l'est pas.

10 Les gènes tardifs (L1 à L5 ; L pour late signifiant tardif en anglais) recouvrent en partie les unités de transcription précoces et sont, pour la plupart, transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (pour Major Late Promoter en anglais). Ce promoteur permet la synthèse d'un long transcrit primaire qui est ensuite mûré en une vingtaine d'ARN messagers (ARNm) à partir desquels  
15 sont produites les protéines capsidaires du virion. Le gène codant pour la protéine structurale IX composant la capside est situé à l'extrémité 5' du génome adénoviral et recouvre l'extrémité 3' de la région précoce E1B. L'unité transcriptionnelle de la protéine IX utilise le même signal de terminaison de la transcription que l'unité transcriptionnelle E1B.

20 Les vecteurs adénoviraux recombinants utilisés à des fins de thérapie génique sont déficients pour la replication afin d'éviter leur dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte. D'une manière générale, ils dérivent du génome d'un adénovirus par délétion de la majorité de la région E1 et certains comportent des délétions supplémentaires au niveau des régions E2, E3 et/ou E4  
25 afin d'accroître leur capacité de clonage ou réduire les problèmes d'inflammation liés à l'expression des gènes viraux restants. Les gènes d'intérêt sont introduits dans l'ADN viral à la place de l'une ou l'autre région délétée. Ils ne peuvent être propagés que par trans-complémentation des fonctions adénovirales pour lesquelles ils sont déficients. A l'heure actuelle, les seules  
30 lignées cellulaires de complémentation utilisables sont la lignée 293 (Graham et

al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72) complétant la fonction adénovirale E1 ou des lignées dérivant de cette dernière aptes à trans-complémenter plusieurs fonctions adénovirales E1 et E4 (Yeh et al., 1996, J. Virol. 70, 559-565 ; Wang et al., 1995, Gene Therapy 2, 775-783 ; Krougliak et Graham, 1995, Human Gene Therapy 6, 1575-1586) ou E1 et E2 .

La lignée 293 a été obtenue par intégration dans une cellule de rein embryonnaire humain de l'extrémité 5' du génome de l'adénovirus de type 5 (Ad5) et contient des séquences qui se trouvent aussi dans le vecteur recombinant déficient et qui lui sont indispensables comme l'ITR 5', la région d'encapsidation et les séquences codant pour la protéine IX (la partie 3' de la région E1B intégrée dans les cellules 293 ne permet pas la synthèse d'une protéine IX fonctionnelle d'où l'obligation de conserver le gène IX dans les vecteurs). Ceci a pour conséquence la production de particules virales répliquatives (RCA) générées par recombinaison entre les séquences adénovirales du vecteur et celles du génome cellulaire. Deux événements de recombinaison au niveau de l'ITR 5' ou la séquence d'encapsidation et les séquences IX suffisent à générer un virus sauvage compétent pour la répllication.

La formation de ces particules virales répliquatives constitue un obstacle majeur à l'utilisation des vecteurs adénoviraux en thérapie génique. D'une part du point de vue du concept car il n'est pas envisageable d'administrer une particule capable de se disséminer dans l'organisme ou l'environnement. Et d'autre part, du point de vue de leur production, car il est nécessaire de limiter le nombre de générations lors de la culture de la lignée de complémentation transfectée par le vecteur adénoviral, pour éviter au maximum l'apparition des particules virales répliquatives d'où la difficulté d'obtenir des préparations ayant un titre viral élevé. On imagine aisément les difficultés susceptibles d'être rencontrées lors de la production de lots cliniques non contaminés par une particule RCA.

Le but de la présente invention est précisément de mettre à la disposition

- 4 -

du public des vecteurs adénoviraux plus sûrs minimisant le risque de production de particules virales répliquatives tout en permettant le transfert et l'expression de gènes thérapeutiques. On a maintenant construit de nouveaux vecteurs adénoviraux recombinants déletés des régions E1 et E3 dans lesquels la séquence  
5 codant pour la protéine IX est intégrée à la place de la région E3. Ainsi, en cas de recombinaison entre les séquences IX homologues présentes dans le vecteur et la lignée 293, on favorisera la production d'une particule virale non fonctionnelle pour la région E2 incapable de répllication autonome.

Les vecteurs adénoviraux de la présente invention proposent une solution  
10 avantageuse aux inconvénients inhérents à l'utilisation des vecteurs de l'art antérieur. En effet, ils peuvent être propagés dans les cellules de complémentation conventionnelles dérivées de la lignée 293 avec un titre plus élevé compatible avec les besoins industriels et les risques de formation de particules virales répliquatives sont réduits. Ils sont tout particulièrement adaptés  
15 à la thérapie génique humaine.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un vecteur adénoviral défectif pour la replication capable d'être répliqué dans une cellule de complémentation, qui dérive du génome d'un adénovirus et comprenant une séquence homologue à une séquence intégrée dans ladite cellule de  
20 complémentation, caractérisé en ce qu'une partie au moins de ladite séquence homologue est déplacée dans ledit vecteur adénoviral de manière à être localisée à un endroit différent de son positionnement naturel dans ledit génome adénoviral.

Un vecteur adénoviral selon l'invention peut dériver d'un adénovirus  
25 d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral de différentes origines. On peut citer plus particulièrement les adénovirus CAV-1 ou CAV-2 d'origine canine, DAV d'origine aviaire ou encore Bad de type 3 d'origine bovine (Zakharchuk et al., 1993, Arch. Virol., 128, 171-176 ; Spibey  
30 et Cavanagh, 1989, J. Gen. Virol., 70, 165-172 ; Jouvenne et al., 1987, Gene,

- 5 -

60, 21-28 ; Mittal et al., 1995, J. Gen. Virol., 76, 93-102). Cependant, on préférera un vecteur adénoviral dérivé d'un adénovirus humain, de préférence, de sérotype C et, de manière tout à fait préférée, de type 2 ou 5 (Graham et Preveet, 1991, Methods in Molecular Biology, vol 7, p 109-128 ; Ed : E.J. Murey, The Human Press Inc.).

Au sens de la présente invention, un "vecteur adénoviral défectif pour la replication" désigne un vecteur incapable de replication autonome dans une cellule hôte. Généralement, un tel vecteur est obtenu à partir d'un adénovirus dont le génome a été modifié de manière à rendre non fonctionnels un ou plusieurs gènes viraux essentiels à sa replication. Ces modifications peuvent être diverses (délétion, mutation et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides) et localisées dans les régions codantes du génome viral ou en dehors de celles-ci, par exemple dans les régions promotrices. La propagation d'un tel vecteur est effectuée dans une cellule de complémentation capable de fournir *en trans* la ou les fonction(s) défectueuse(s) c'est à dire de produire les protéines précoces et/ou tardives nécessaires à la constitution d'une particule virale infectieuse. Par "particule virale infectieuse", on entend une particule virale ayant la capacité d'infecter une cellule hôte et d'y faire pénétrer le génome viral.

A titre illustratif, un vecteur adénoviral préféré selon l'invention est dépourvu de la majorité de la région E1 à l'exception des séquences recouvrant l'unité transcriptionnelle du gène codant pour la protéine IX qui ne peut être complétée par la lignée 293. Il peut être dépourvu, de manière optionnelle, de la région E3. Cependant, selon un mode avantageux, on préfère conserver la partie de la région E3 codant pour la protéine gp19k (Gooding et Wold, 1990, Critical Reviews of Immunology 10, 53-71) placée sous le contrôle de son propre promoteur ou d'un promoteur hétérologue conventionnel. Bien entendu, un vecteur adénoviral selon l'invention peut comprendre des délétions ou mutations supplémentaires de tout ou partie d'autres gènes viraux, notamment au sein des régions E2, E4 et/ou L1-L5 (voir par exemple la demande internationale WO 94/28152). Pour illustrer ce point, on peut citer la mutation

- 6 -

thermosensible affectant le gène DBP (pour DNA Binding Protein en anglais) de la région E2A (Ensinger et al., 1972, *J. Virol.* 10, 328-339). Une autre variante ou une combinaison intéressante consiste à déléter la région E4 à l'exception des séquences codant pour les cadres de lecture ouverts (ORF) 6 et 7 (ces délétions limitées ne nécessitent pas de complémentation de la fonction E4 ; Ketner et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17, 3037-3048). On aura alors recours à des lignées de complémentation adaptées aux déficiences du vecteur adénoviral selon l'invention, comme la lignée 293 pour compléter la fonction E1 ou les lignées dérivées telles que celles citées précédemment pour une double complémentation.

Un vecteur adénoviral selon l'invention est caractérisé en ce qu'une partie ou la totalité des séquences homologues à celles présentes dans la lignée de complémentation est déplacée dans le génome du vecteur adénoviral de sorte qu'elle n'occupe plus la position initiale qu'elle a dans le génome de l'adénovirus parental dont il dérive. Par partie, on entend au moins une centaines de paires de bases et de préférence au moins 0,5 kb. Homologue signifie identique ou suffisamment homologue pour induire un événement de recombinaison intermoléculaire. A titre indicatif, le degré d'homologie entre les séquences adénovirales présentes dans le vecteur et la lignée de complémentation est supérieur à 70 %, avantageusement supérieur à 80 %, de préférence supérieur à 90 % et, de manière tout à fait préférée, aux environs de 100 %.

Un mode de réalisation avantageux consiste à déplacer tout ou partie des séquences homologues au delà d'un gène essentiel à la replication du vecteur adénoviral selon l'invention. De préférence, les séquences déplacées sont constituées par le gène codant pour la protéine IX, et celui-ci est inséré en 3' de la région E2, plus particulièrement au sein de la région E3. Un vecteur adénoviral préféré est dépourvu des régions E1 et E3 et comprend une cassette d'expression d'un gène d'intérêt à la place de la région E1 et le gène codant pour la protéine IX muni de son propre promoteur ou d'un promoteur hétérologue à la place de la région E3. Selon une autre variante, il peut être



- 7 -

inséré au niveau de la région E4 ou à la place de cette dernière.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un vecteur adénoviral selon l'invention permet de réduire la formation de particules virales répliquatives lors de sa propagation dans la lignée de complémentation adéquate, 5 avantageusement d'un facteur au moins 2, de préférence d'un facteur au moins 5 et, de manière tout à fait préférée d'un facteur au moins 10. Les techniques pour évaluer les particules virales répliquatives dans une préparation adénovirales sont connues de l'homme de l'art. A titre indicatif, on peut procéder selon le protocole décrit à l'exemple 3.

10 Selon un mode de réalisation préféré, un vecteur adénoviral selon l'invention est recombinant et comprend une séquence nucléotidique exogène placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte. "Séquence nucléotidique exogène" fait référence à un acide nucléique qui peut être d'une origine quelconque et qui n'est normalement pas 15 présent dans le génome d'un virus parental en usage dans la présente invention. Dans le cadre de l'invention, la séquence nucléotidique exogène peut-être constituée d'un ou plusieurs gènes et, en particulier, de gène(s) d'intérêt thérapeutique.

D'une manière générale, la séquence nucléotidique exogène peut coder 20 pour un ARN anti-sens et/ou un ARNm qui sera ensuite traduit en protéine d'intérêt. Elle peut être de type génomique, de type ADN complémentaire (ADNc) ou de type mixte (minigène, dans lequel au moins un intron est délété). Elle peut coder pour une protéine mature ou un précurseur d'une protéine mature, notamment un précurseur destiné à être sécrété et comprenant un 25 peptide signal. Par ailleurs, il peut s'agir de tout ou partie d'une protéine telle que trouvée dans la nature (protéine native ou tronquée) ou également d'une protéine chimérique provenant de la fusion de séquences d'origines diverses ou encore mutée présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées. De telles protéines peuvent être obtenues par les techniques conventionnelles de 30 biologie moléculaire.

- 8 -

Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux d'utiliser les gènes codant pour les polypeptides suivants:

- cytokines ou lymphokines (interférons  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , interleukines et notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou l'IL-12, facteurs nécrosant des tumeurs (TNF), facteurs stimulateurs de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...);
- récepteurs cellulaires ou nucléaires, notamment ceux reconnus par des organismes pathogènes (virus, bactéries, ou parasites) et, de préférence, par le virus VIH (Virus de l'Immunodéficience Humain) ou leurs ligands;
- protéines impliquées dans une maladie génétique (facteur VII, facteur VIII, facteur IX, dystrophine ou minidystrophine, insuline, protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), hormones de croissance (hGH);
- enzymes (uréase, rénine, thrombine....);
- inhibiteurs d'enzymes ( $\alpha$ 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteurs de protéases virales...);
- polypeptides à effet anti-tumoral capables d'inhiber au moins partiellement l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers (ARN anti-sens, anticorps, inhibiteurs agissant au niveau de la division cellulaire ou des signaux de transduction, produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, par exemple p53 ou Rb, protéines stimulant le système immunitaire....);
- protéines du complexe majeur d'histocompatibilité des classes I ou II ou protéines régulatrices agissant sur l'expression des gènes correspondants;
- polypeptides capables d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement (polypeptides antigéniques ayant des propriétés immunogènes, épitopes antigéniques, anticorps, variants trans-dominants susceptibles d'inhiber l'action d'une protéine native par

compétition...);

- toxines ( thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique.....) ou immunotoxines ; et
- marqueurs ( $\beta$ -galactosidase, luciférase.....).

5 Il est à signaler que cette liste n'est pas limitative et que d'autres gènes peuvent également être employés.

Par ailleurs, une séquence nucléotidique exogène en usage dans la présente invention peut, en outre, comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées. On peut citer les gènes *neo*  
10 (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une résistance à l'antibiotique G418, *dhfr* (Dihydrofolate Réductase), CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), *pac* (Puromycine Acétyl-Transferase) ou encore *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase). D'une manière générale, les gènes de sélection sont connus de l'homme de l'art.

15 Par éléments nécessaires à l'expression d'une séquence nucléotidique exogène dans une cellule hôte, on entend l'ensemble des éléments permettant sa transcription en ARN (ARN anti-sens ou ARNm) et la traduction d'un ARNm en protéine. Parmi ceux-ci, le promoteur revêt une importance particulière. Il peut être isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote ou même virale et peut  
20 être constitutif ou régulable. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène en question. Par ailleurs, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice de la transcription, rendre un promoteur constitutif régulable ou vice versa, introduire un site de restriction.....On peut mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs  
25 viraux CMV (Cytomegalovirus), RSV (Rous Sarcoma Virus), du gène TK du virus HSV-1, précoce du virus SV40 (Simian Virus 40), adénoviral MLP .... ou encore les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycerate kinase) murin ou humain,  $\alpha$ 1-antitrypsine (foie-spécifique), immunoglobulines (lymphocyte-spécifique).

30 Bien entendu, une séquence nucléotidique exogène en usage dans la

présente invention peut en outre comprendre des éléments additionnels nécessaires à l'expression (séquence intronique, séquence signal, séquence de localisation nucléaire, séquence terminatrice de la transcription, site d'initiation de la traduction de type IRES ou autre....) ou encore à sa maintenance dans la

5 cellule hôte. De tels éléments sont connus de l'homme de l'art.

L'invention a également trait à une particule virale infectieuse ainsi qu'à une cellule hôte eucaryote comprenant un vecteur adénoviral selon l'invention. Ladite cellule hôte est avantageusement une cellule de mammifère et, de préférence, une cellule humaine et peut comprendre ledit vecteur sous forme

10 non intégrée ou également intégrée dans le génome. Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage ...), musculaire, hépatique, épithéliale ou fibroblaste.

Une particule virale infectieuse selon l'invention peut être préparée selon

15 toute technique conventionnelle dans le domaine de l'art (Graham et Preveet, 1991, *supra*), par exemple, par co-transfection d'un vecteur et d'un fragment adénoviral dans une cellule appropriée ou encore par le moyen d'un virus auxiliaire fournissant *en trans* les fonctions virales non fonctionnelles. Il est également envisageable de générer le vecteur viral *in vitro* dans *Escherichia coli*

20 (*E. coli*) par ligation ou encore recombinaison homologue (voir par exemple la demande française 94 14470).

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une particule virale infectieuse comprenant un vecteur adénoviral selon l'invention, selon lequel :

- 25
- (i) on introduit ledit vecteur adénoviral dans une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une cellule de complémentation transfectée,
  - (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite

- 11 -

particule virale infectieuse, et

- (iii) on récupère ladite particule virale infectieuse dans la culture cellulaire.

Bien entendu, la particule virale infectieuse peut être récupérée du surnageant de culture mais également des cellules. Une des méthodes couramment employée consiste à lyser les cellules par des cycles consécutifs de congélation/décongélation pour recueillir les virions dans le surnageant de lyse. Selon un mode de réalisation avantageux, on met en oeuvre (i) un vecteur adénoviral délété de tout ou partie des régions E1 et E3 à l'exception des séquences recouvrant le gène codant pour la protéine IX, et (ii) la cellule de complémentation 293.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur adénoviral, une particule virale infectieuse ou une cellule hôte eucaryote selon l'invention en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. La composition selon l'invention est, en particulier, destinée au traitement préventif ou curatif de maladies telles que :

- des maladies génétiques (hémophilie, mucoviscidose, diabète ou myopathie, celle de Duchène et de Becker...),
- des cancers, comme ceux induits par des oncogènes ou des virus,
- des maladies virales, comme l'hépatite B ou C et le SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise résultant de l'infection par le VIH), et
- des maladies virales récurrentes, comme les infections virales provoquées par le virus de l'herpès.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace de l'agent thérapeutique ou prophylactique à un support tel qu'un diluant. Une composition selon l'invention peut être administrée par voie locale, systémique ou par aérosol, en particulier par voie

- 12 -

intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale intrapulmonaire, intranasale ou intratrachéale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu ou de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) d'intérêt à transférer. En particulier, les particules virales selon l'invention peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  ufp (unités formant des plages), avantageusement  $10^5$  et  $10^{13}$  ufp et, de préférence,  $10^6$  et  $10^{12}$  ufp. La formulation peut également inclure un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Enfin, la présente invention est relative à l'usage thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur adénoviral, d'une particule virale infectieuse ou d'une cellule hôte eucaryote selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, dans une tumeur accessible, dans les poumons par aérosol...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient.

L'invention s'étend également à une méthode de traitement selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur adénoviral, d'une particule virale ou d'une cellule hôte eucaryote selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement.

La présente invention est plus complètement décrite en référence aux Figures suivantes et à l'aide des exemples suivants.

La Figure 1 est une représentation schématique du génome de l'adénovirus humain de type 5 (représenté en unités arbitraires de 0 à 100), indiquant

l'emplacement des différents gènes.

La Figure 2 est une représentation schématique du vecteur adénoviral pTG5663 délété de la région E1 (remplacée par une cassette CMV promoteur - SV40 polyA) et des séquences codant pour la protéine IX.

5 La Figure 3 est une représentation schématique du vecteur pTG8343 comprenant l'extrémité 5' du génome de l'Ad5 délétée d'une partie de la région E1 (nt 459 à 3327).

La Figure 4 est une représentation schématique du vecteur adénoviral pTG5665 délété de la région E1 (remplacée par une cassette CMV promoteur -  
10 SV40 polyA) et de la région E3 (remplacée par les séquences codant pour la protéine IX en orientation sens).

La Figure 5 est une représentation schématique du vecteur adénoviral pTG5664 délété de la région E1 (remplacée par une cassette CMV promoteur - SV40 polyA) et de la région E3 (remplacée par les séquences codant pour la  
15 protéine IX en orientation antisens).

La Figure 6 est une représentation schématique du vecteur adénoviral pTG5668 délété de la région E1 (remplacée par une cassette CMV promoteur - gène IL2-SV40 polyA) et de la région E3 (remplacée par les séquences codant pour la protéine IX en orientation antisens).

20 La Figure 7 est une représentation schématique du vecteur adénoviral pTG5669 délété de la région E1 (remplacée par une cassette CMV promoteur - gène IL2-SV40 polyA) et de la région E3 (remplacée par les séquences codant pour la protéine IX en orientation sens).

## 25 EXEMPLES

Les exemples suivants n'illustrent qu'un mode de réalisation de la présente invention

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques  
30 générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et

- 14 -

al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de clonage mettant en oeuvre des plasmides bactériens sont de préférence réalisées dans la souche *E. coli* BJ 5183 (Hanahan, 1983, J Mol Biol 166, 557-580). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow). Les techniques d'amplification par PCR (Polymérase Chain Reaction) sont connues de l'homme de l'art (voir par exemple PCR Protocols - A guide to methods and applications, 1990, édité par Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc).

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On peut citer la technique au phosphate de calcium (Maniatis et al., *supra*), mais tout autre protocole peut également être employé, tel que la technique au DEAE dextran, l'électroporation, les méthodes basées sur les chocs osmotiques, la microinjection ou les méthodes basées sur l'emploi de liposomes. Quant aux conditions de culture, elles sont classiques. Dans les exemples qui suivent, on a recours à la lignée cellulaire 293 (Graham et al, 1977, *supra* ; disponible à l'ATCC sous la référence CRL1573) Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées.

Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genebank sous la référence M73260.

EXEMPLE 1 Construction d'un vecteur adénoviral dans lequel le gène codant pour la protéine IX est déplacé au niveau de la région E3.

A. Construction d'un vecteur adénoviral délété des séquences codant pour la protéine pIX



- 15 -

On utilise tout d'abord le vecteur pTG6580 dont la construction est décrite dans la demande internationale WO 94/28152 (exemple 2). Celui-ci comprend dans une structure p poly II (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201), l'ITR 5' et la séquence d'encapsulation de l'Ad5 (nucléotides (nt) 1 à 458), le promoteur MLP de l'adénovirus 2, un polylinker utilisable pour le clonage d'un gène d'intérêt, le signal de terminaison de la transcription du virus SV40 (nt 2543 à 2618 du génome SV40 tel que divulgué dans Genbank sous la référence J02400) suivis des séquences de l'Ad5 allant des nt 4047 à 6241. Le fragment *Bam*HI *Bst*XI de pTG6580 porteur des séquences poly A SV40 et adénovirales (nt 4047 à environ 4790) est purifié et introduit dans le vecteur pTG5623 préalablement digéré par ces mêmes enzymes. Ce dernier diffère de pTG6580 en ce qu'il comprend le promoteur CMV (Thomsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 659-663) à la place du MLP et les séquences Ad5 des nucléotides 3328 à 5788 au lieu du fragment 4047 à 6241. On obtient pTG5654 qui porte les séquences Ad5 1 à 458, le promoteur CMV, le polylinker, le poly A de SV40 et les séquences Ad5 4047 à 5788 dépourvues du gène codant pour la protéine IX.

Puis on construit un adénovirus E1

IX

 par recombinaison homologue. On utilise à cet effet le vecteur pTG3602 qui résulte du clonage du génome de l'Ad5 dans le p poly II (décrit dans la demande française 94 14470 ; exemple 1). Les cellules *E. coli* BJ5183 sont cotransformées par le fragment *Pac*I et *Bst*EII de pTG5654 et le vecteur pTG3602 linéarisé par *Cl*aI pour générer pTG5663 (Figure 2). Celui-ci correspond aux séquences Ad5 délétées de la région E1 et du gène codant pour la protéine IX et comprend à leur place la cassette promoteur CMV, polylinker et poly A de SV40.

*B. Clonage du gène codant pour la protéine pIX au niveau de la région E3 d'un vecteur adénoviral.*

- 16 -

On part du vecteur pTG8343 lequel provient de l'insertion dans p polyII d'une partie de l'extrémité 5' du génome de l'Ad5, à savoir les séquences s'étendant des nucléotides 1 à 458 et 3328 à 5788 (Figure 3). On purifie de ce dernier le fragment *Bgl*II-*Bss*HII porteur des séquences pIX (nt 3328 à 4105).  
5 Après action de la Klenow pour rendre les extrémités franches, il est inséré dans le site *Bgl*II (également traité à la Klenow) du vecteur pTG4664 décrit dans la demande française 95 08946. A titre indicatif, ce dernier comporte le fragment adénoviral *Kpn*I-*Hpa*I (nt 25838 à 32004) délété de la majorité de la région E3 (nt 27871 à 30748). On obtient les vecteurs pTG5659 et pTG5660 selon  
10 l'orientation du gène pIX.

Le gène pIX est intégré dans un contexte adénoviral par recombinaison homologue dans la souche BJ5183 cotransformée avec le vecteur pTG5663 clivé par *Sfr*I et le fragment *Apa*I de pTG5659 ou pTG5660, pour donner respectivement pTG5665 ou pTG5664 (Figures 4 et 5).

15 Après transfection dans la lignée 293, on obtient des virus indiquant que la séquence pIX est fonctionnelle hors de son contexte génomique.

EXEMPLE 2 Construction d'un vecteur adénoviral recombinant comprenant un gène codant pour une cytokine à la place de la région E1 et celui codant pour la protéine IX à la place de la région E3

20

Le clonage de la séquence ADNc codant pour l'IL-2 a été initialement publiée par Taniguchi et al. (1983, Nature 302, 305). Les séquences codant pour l'IL-2 humaine sont isolées des vecteurs de l'art antérieur par les techniques  
25 conventionnelles de la biologie moléculaire (par exemple pTG26 décrit dans la demande française 85 09480). L'homme du métier est en mesure de générer des amorces PCR adéquates incluant des sites de restriction appropriés

Les séquences IL-2 munies de sites francs à chaque extrémité sont insérées dans le vecteur pTG5664 clivé par *Bgl*II et traité par la Klenow, pour donner  
30 pTG5662. Ce dernier comporte les séquences Ad5 1 à 458 suivies de la cassette

"promoteur CMV, gène IL-2 humain et poly A SV40" et du fragment adénoviral 4047 à 5788. On génère le vecteur pTG5667 par recombinaison homologue dans la souche *E. coli* BJ5183 entre le vecteur pTG3602 linéarisé par *ClaI* et le fragment *PacI-BstEII* issu de pTG5662. Enfin, on procède à une dernière étape de recombinaison homologue entre le vecteur pTG5667 clivé par *SfrI* et le fragment *ApaI* obtenu de pTG5659 ou pTG5660. On obtient les vecteurs pTG5668 et pTG5669 (Figures 6 et 7) qui portent l'ITR 5', la région d'encapsidation de l'Ad5, la cassette d'expression de l'IL-2 et les séquences adénovirales 4047 à 35935 délétées de la région E3 à la place de laquelle est intégré le gène codant pour la protéine pIX. Ces deux vecteurs diffèrent par l'orientation de ce dernier.

Après transfection dans les cellules 293 sous forme de fragments *PacI*, on constitue un stock viral qui sera réparti en doses de  $10^8$  à  $10^{10}$  pfu utilisables dans le cadre de traitement anti-cancéreux. Le titre peut être déterminé par les techniques classiques comme la méthode agar, et la présence de RCA recherchée selon la technique indiquée ci-après.

On a également construit un vecteur adénoviral dans lequel les séquences pIX ont été intégrées en orientation antisens en remplacement de la région E3 et comprenant au niveau de la délétion E1 le gène IFN $\gamma$  sous le contrôle du promoteur CMV. Le gène IFN $\gamma$  peut être isolé des plasmides de l'art antérieur (par exemple M13TG05 ou pVVTG41 décrits dans le brevet français S5 09225) et peut être introduit dans le génome adénoviral par les techniques classiques de biologie moléculaire ou en remplacement du gène IL2 dans le vecteur précédent par recombinaison homologue. On génère pTG6697 qui après transfection dans la lignée de complémentation 293, donne les particules virales AdTG6697.

On vérifie que les adénovirus recombinants sont aptes à sécréter le produit d'expression pour lequel ils codent. Après transduction de cellules cibles, les quantités d'IL2 et d'IFN $\gamma$  secrétées dans le surnageant de culture sont déterminées par ELISA (kit Quantikine RD System, Minneapolis pour l'IL-2 et kit IFN $\gamma$ -Easia, Medgenix, Fleurus Belgique pour l'IFN $\gamma$ ).

Les cellules A549 (ATCC CCL-185) infectées par AdTG5668 (moi = 100 unités infectieuses (ui)/cellule) produisent 1 à 2  $\mu$ g d'IL-2 /  $10^6$  cellules / 48 h. A

- 18 -

titre indicatif, un vecteur adénoviral de première génération portant la même cassette d'expression mais dans lequel les séquences pIX sont dans leur positionnement naturel produit des quantités d'IL-2 comparables. De même, les niveaux d'IFN $\gamma$  sécrétés par les cellules A549 infectées par AdTG6697 (moi = 5 100 ui/cellule) sont du même ordre de grandeur.

### EXEMPLE 3. Recherche de particules virales répliquatives

Des cellules non permissives (incapables de complémentation) et sensibles à 10 l'infection par un adénovirus, comme par exemple les cellules A549 (ATCC CCL185) sont mises en culture et maintenues selon les conditions standards. Lorsqu'elles atteignent la confluence, le milieu de culture est éliminé et remplacé par un milieu contenant une dose de la préparation adénovirale à tester en respectant une multiplicité d'infection (MOI) comprise entre 1 et 10 (premier 15 passage). Après 90 min d'infection, le milieu est changé et la culture poursuivie de manière classique pendant une quinzaine de jours. La présence de particules virales répliquatives est détectée par l'apparition d'effets cytopathiques. On procède à un nouveau passage sur cellules sensibles du lysat cellulaire recueilli après le premier passage. Pour ce faire, le culot cellulaire est soumis à deux cycles de congélation/ 20 décongélation avant d'être utilisé pour infecter des cellules A459 fraîches. Après 90 minutes d'adsorption, la culture est remise dans du milieu frais et la cytopathie à nouveau observée pendant 6 à 8 jours. Une absence de cytopathie reflète une absence de particules virales répliquatives dans la dose de virus destinée à être administrée. Un témoin positif est constitué par une dose équivalente de la 25 préparation adénovirale contaminée par un virus sauvage Ad5.

Il est également possible de détecter les RCA par PCR à partir de l'ADN isolé d'une dose de la préparation virale à l'aide d'amorces spécifiques de la région E1, celle-ci étant normalement absente des vecteurs adénoviraux. L'amplification d'un fragment E1 spécifique indique la présence de virus sauvages.

Revendications

- 1 Vecteur adénoviral défectif pour la replication capable d'être repliqué dans une  
cellule de complémentation, qui dérive du génome d'un adénovirus et  
5 comprenant une séquence homologue à une séquence intégrée dans ladite  
cellule de complémentation, caractérisé en ce qu'une partie au moins de ladite  
séquence homologue est déplacée dans ledit vecteur adénoviral de manière à  
être localisée à un endroit différent de son positionnement naturel dans ledit  
génome adénoviral.
- 10 2. Vecteur adénoviral selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite  
partie au moins de la séquence homologue est déplacée dans ledit vecteur  
adénoviral de manière à être localisée en 3' d'un gène essentiel à sa  
replication.
- 15 3. Vecteur adénoviral selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite  
partie au moins de la séquence homologue est localisée dans ledit vecteur  
adénoviral à la place de la région E3.
- 20 4. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce  
que ladite partie au moins de la séquence homologue est constituée par le  
gène codant pour la protéine IX d'un adénovirus.
- 25 5. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce  
qu'il dérive du génome d'un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire,  
bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore d'un hybride  
comprenant des fragments de génome adénoviral de différentes origines.
- 30 6. Vecteur adénoviral selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il dérive  
du génome d'un adénovirus humain de type 5.

- 20 -

7. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est au moins dépourvu de tout ou partie de la région E1.
8. Vecteur adénoviral selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est en outre dépourvu de tout ou partie de la région E3.
9. Vecteur adénoviral selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce qu'il est en outre dépourvu de tout ou partie d'une ou plusieurs régions sélectionnées parmi les régions E2, E4, L1, L2, L3, L4 et L5.
10. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique exogène placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte.
11. Vecteur adénoviral selon la revendication 10, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique exogène est sélectionnée parmi les gènes codant pour une cytokine, un récepteur cellulaire ou nucléaire, un ligand, un facteur de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, une hormone de croissance, une enzyme, un inhibiteur d'enzyme, un polypeptide à effet anti-tumoral, un polypeptide capable d'inhiber une infection bactérienne, parasitaire ou virale et, notamment le VIH, un anticorps, une toxine, une immunotoxine et un marqueur.
12. Particule virale infectieuse comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 11.
13. Cellule hôte eucaryote comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 11 ou une particule virale infectieuse selon la revendication 12.

30

- 21 -

14. Procédé de préparation d'une particule virale infectieuse selon la revendication 12, selon lequel :

- 5 (i) on introduit un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 11 dans une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur adénoviral pour obtenir une cellule de complémentation transfectée ;
- 10 (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale infectieuse ; et
- (iii) on récupère ladite particule virale infectieuse dans la culture cellulaire.

15

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que (i) ledit vecteur adénoviral est délété de tout ou partie de la région E1 à l'exception des séquences recouvrant le gène codant pour la protéine IX, de tout ou partie de la région E3 et comprend lesdites séquences codant pour la protéine IX localisée à la place de la région E3 et (ii) ladite cellule de complémentation est la lignée 293.

20

16. Composition pharmaceutique comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 11, une particule virale infectieuse selon la revendication 12 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé de préparation selon la revendication 14 ou 15 ou une cellule hôte eucaryote selon la revendication 13, en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

25

30 17. Usage thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur adénoviral selon l'une

- 22 -

des revendications 1 à 11, d'une particule virale infectieuse selon la revendication 12 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé de préparation selon la revendication 14 ou 15 ou d'une cellule hôte eucaryote selon la revendication 13, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement

5 du corps humain ou animal par thérapie génique.



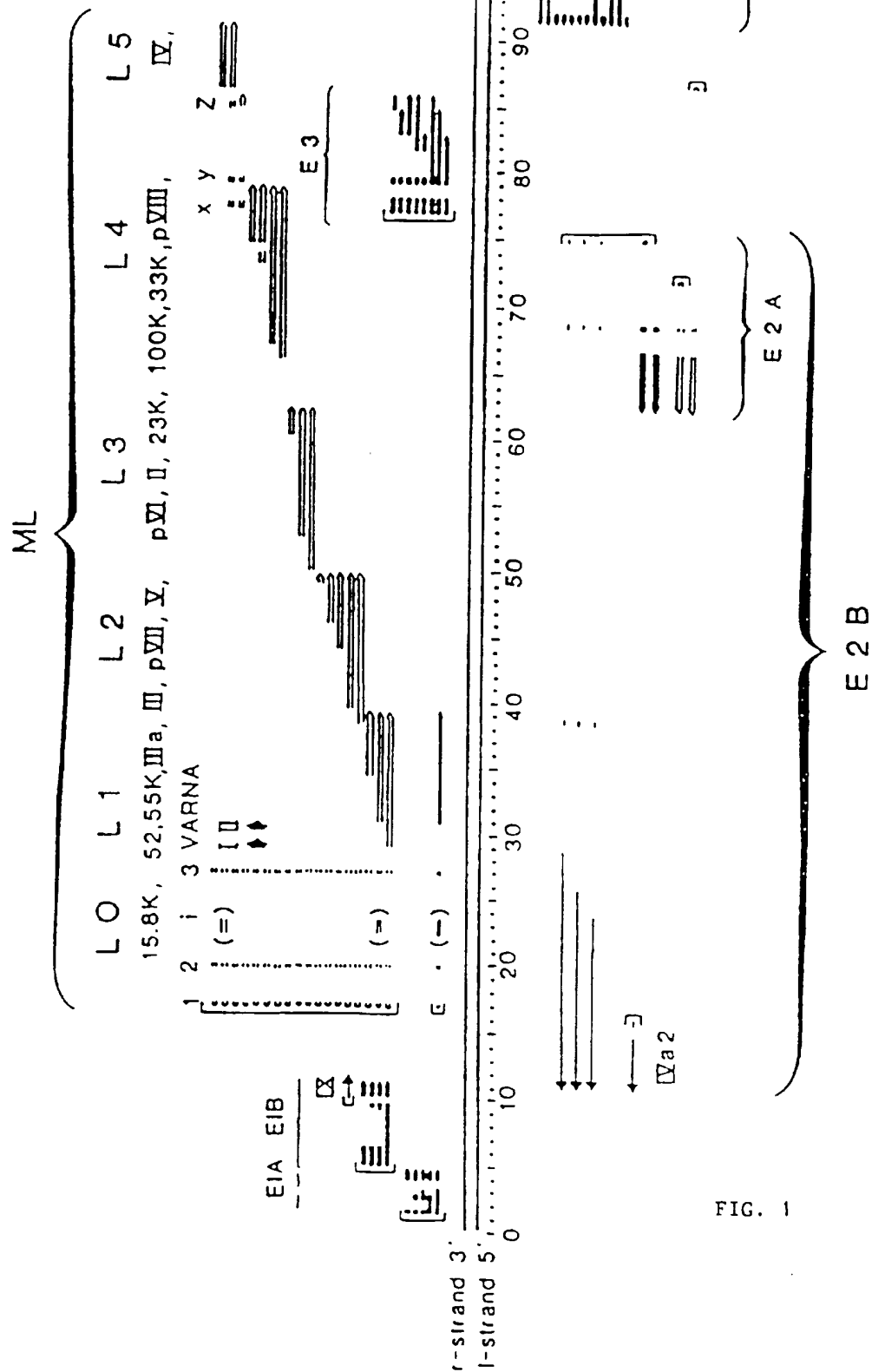


FIG. 1

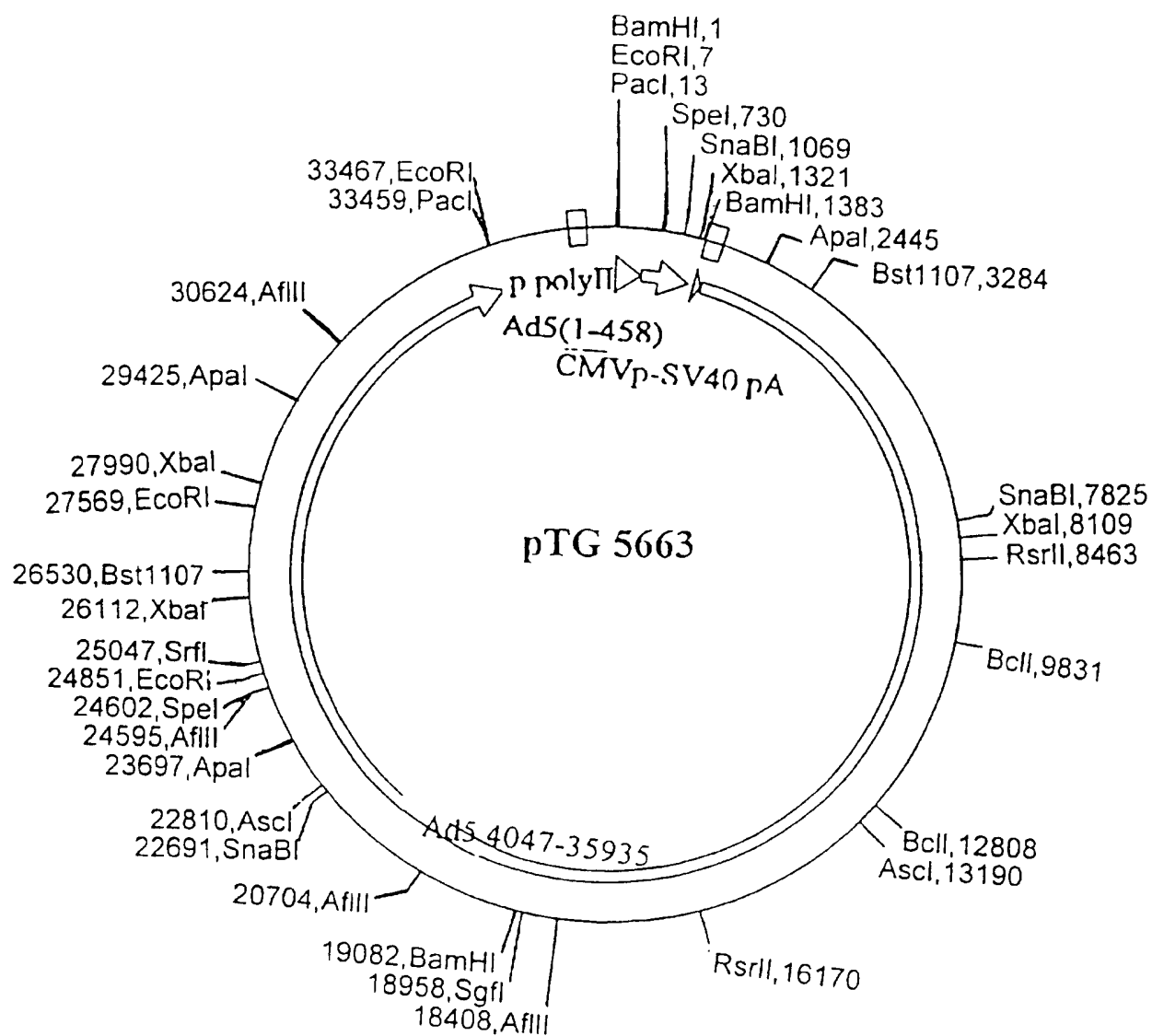


FIG. 2

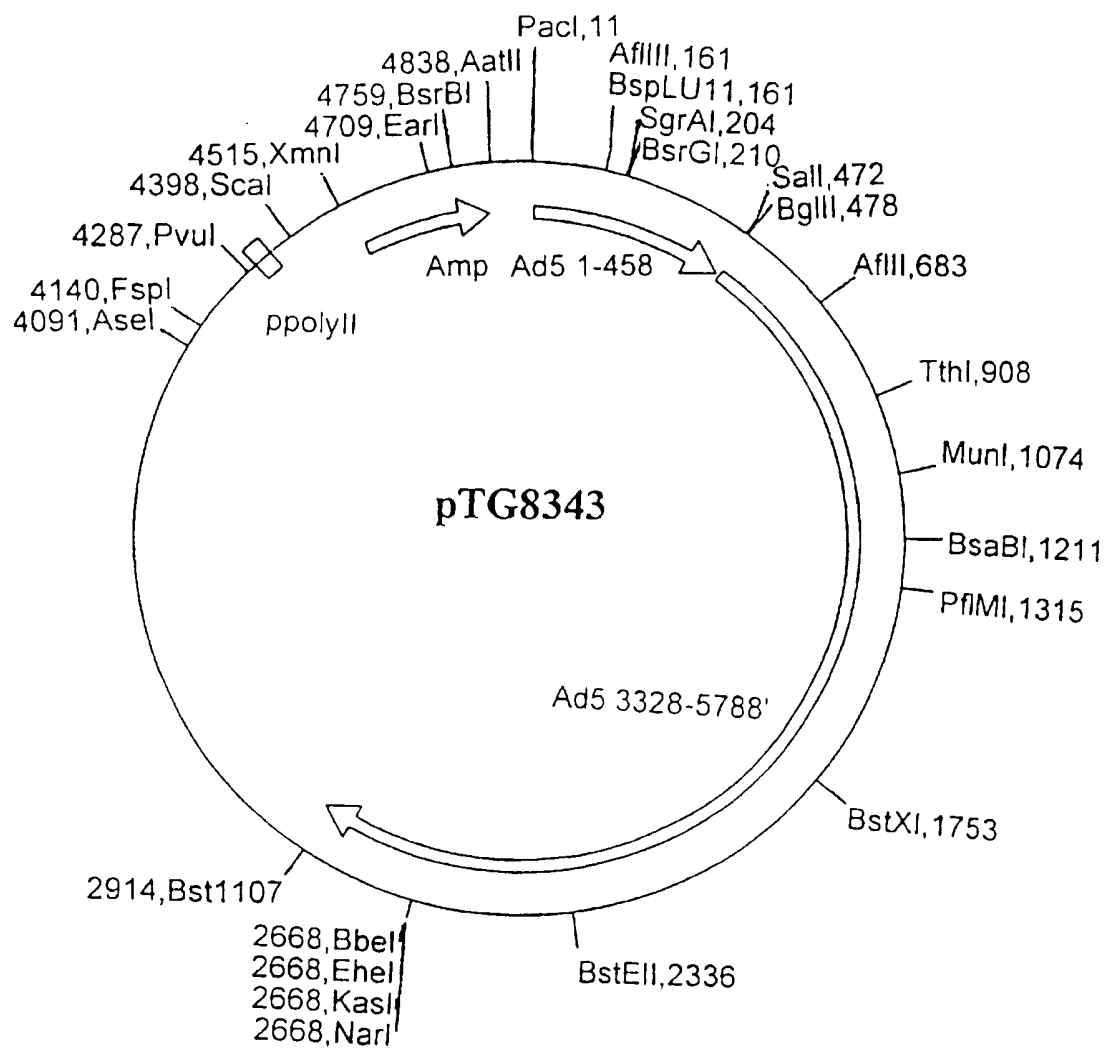


FIG. 3

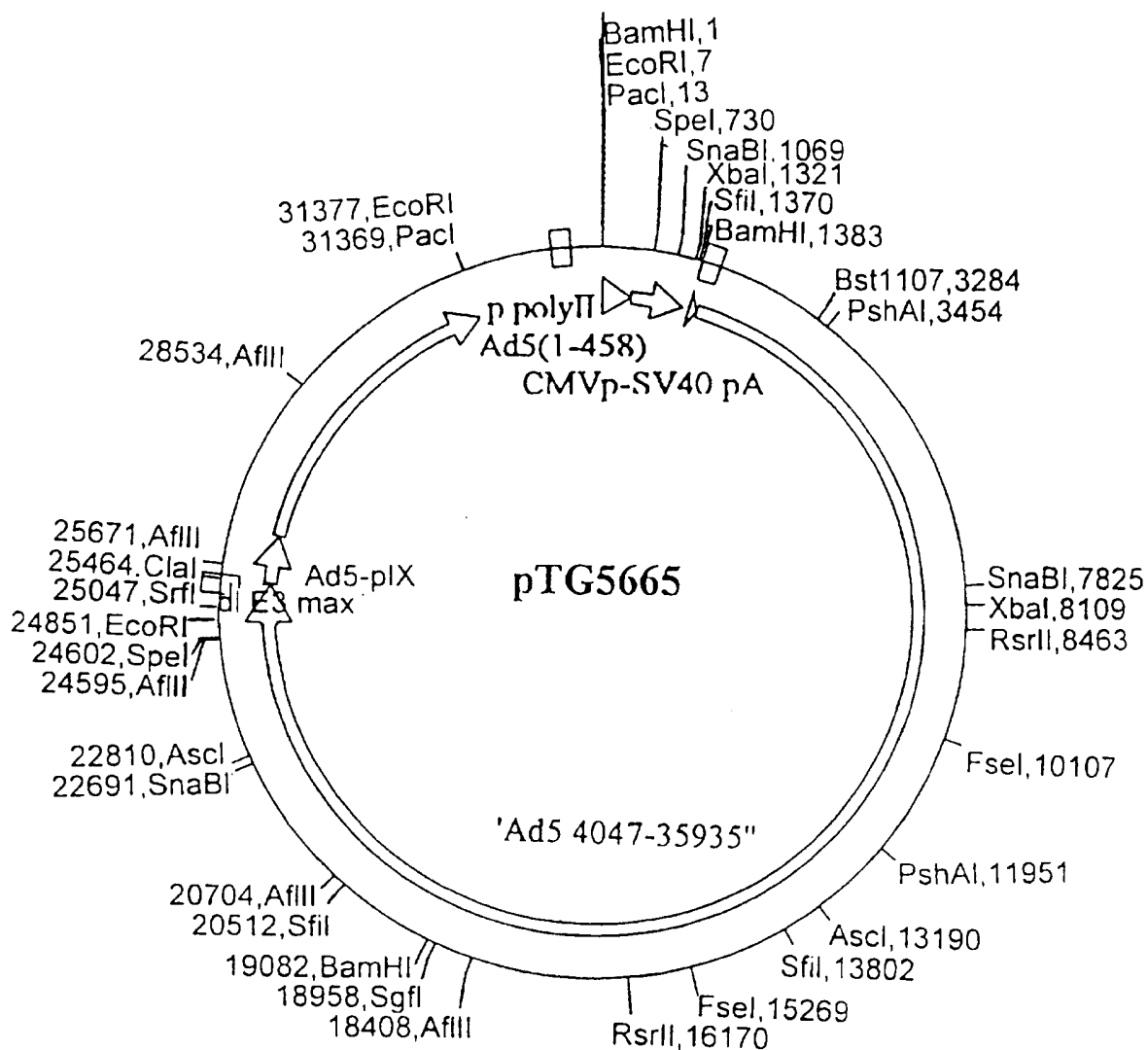


FIG. 4

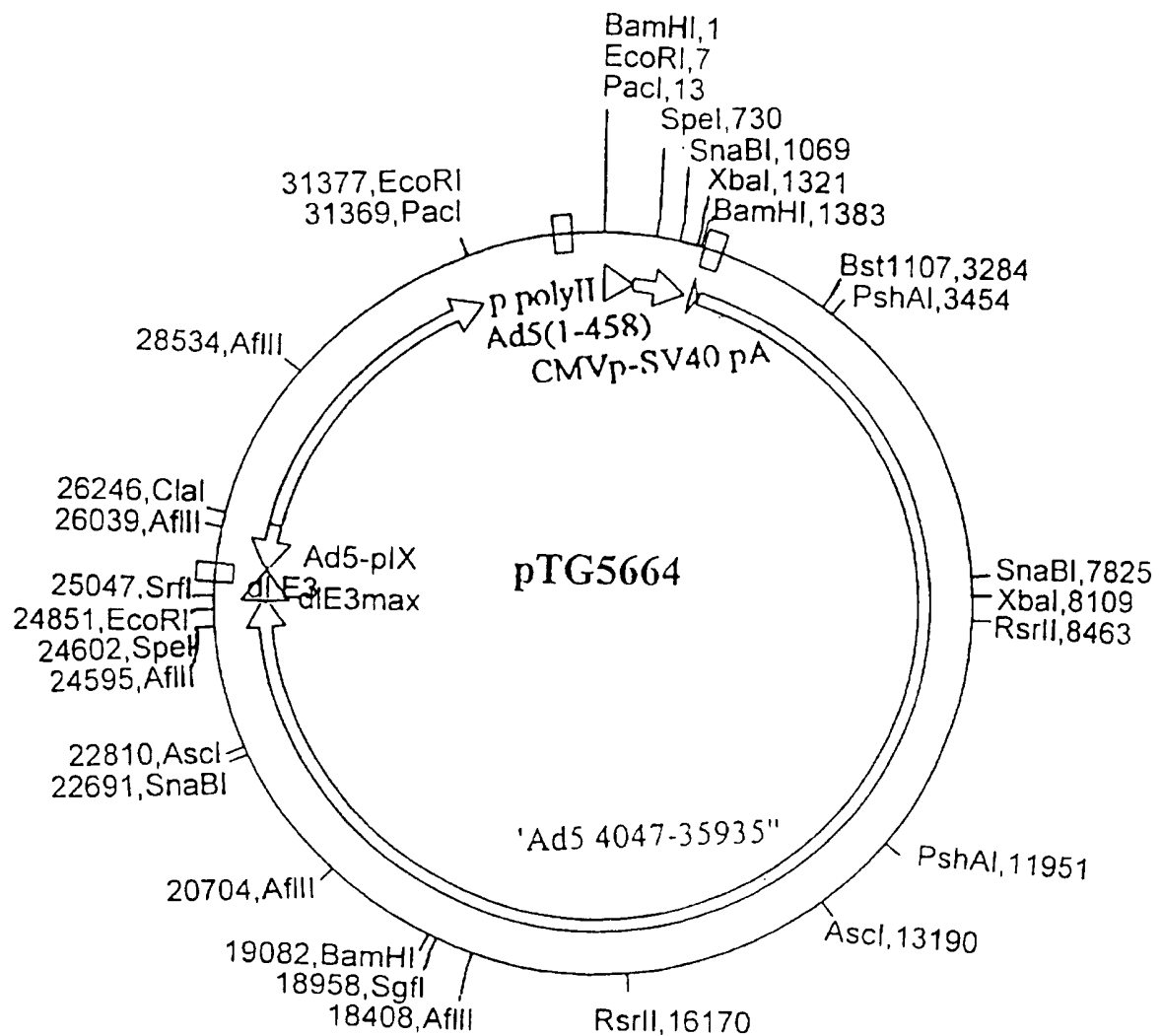


FIG. 5

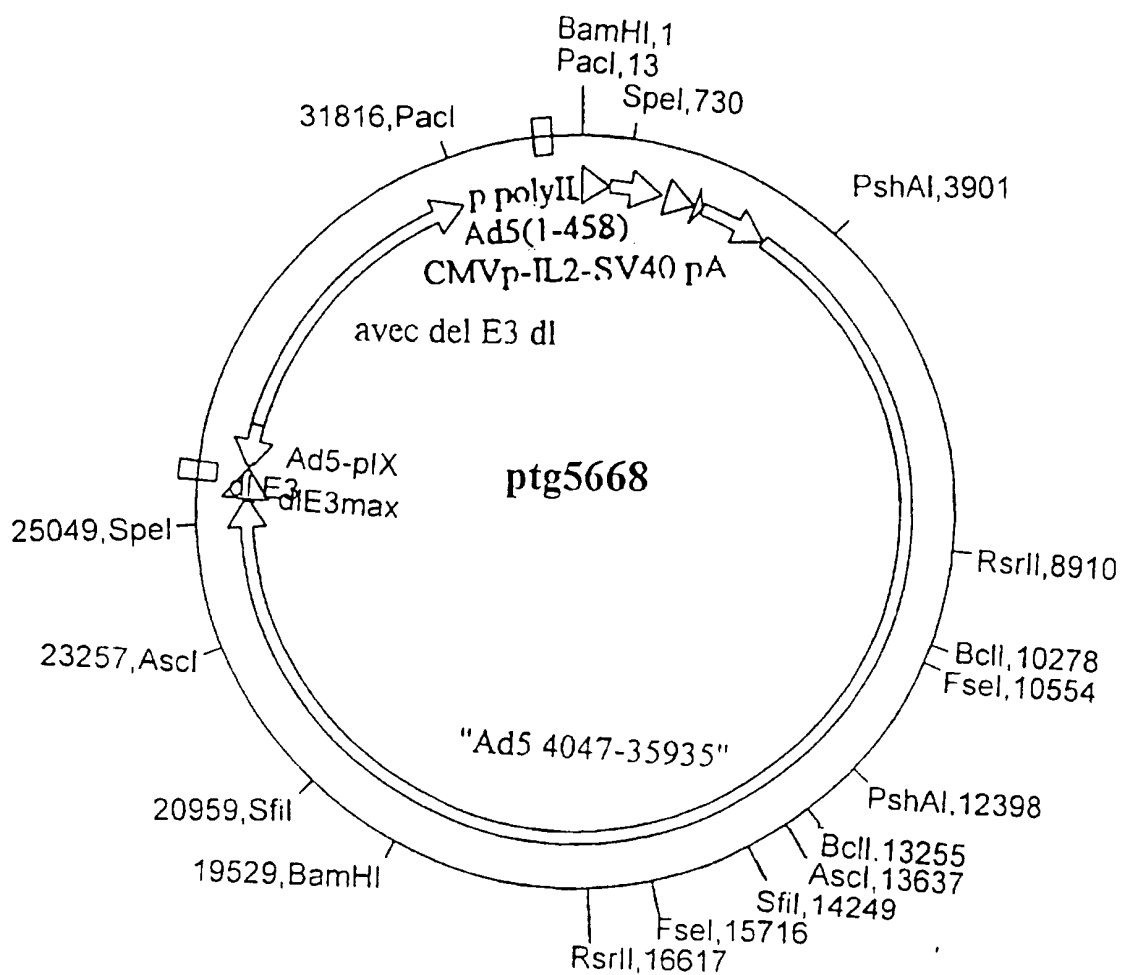


FIG. 6

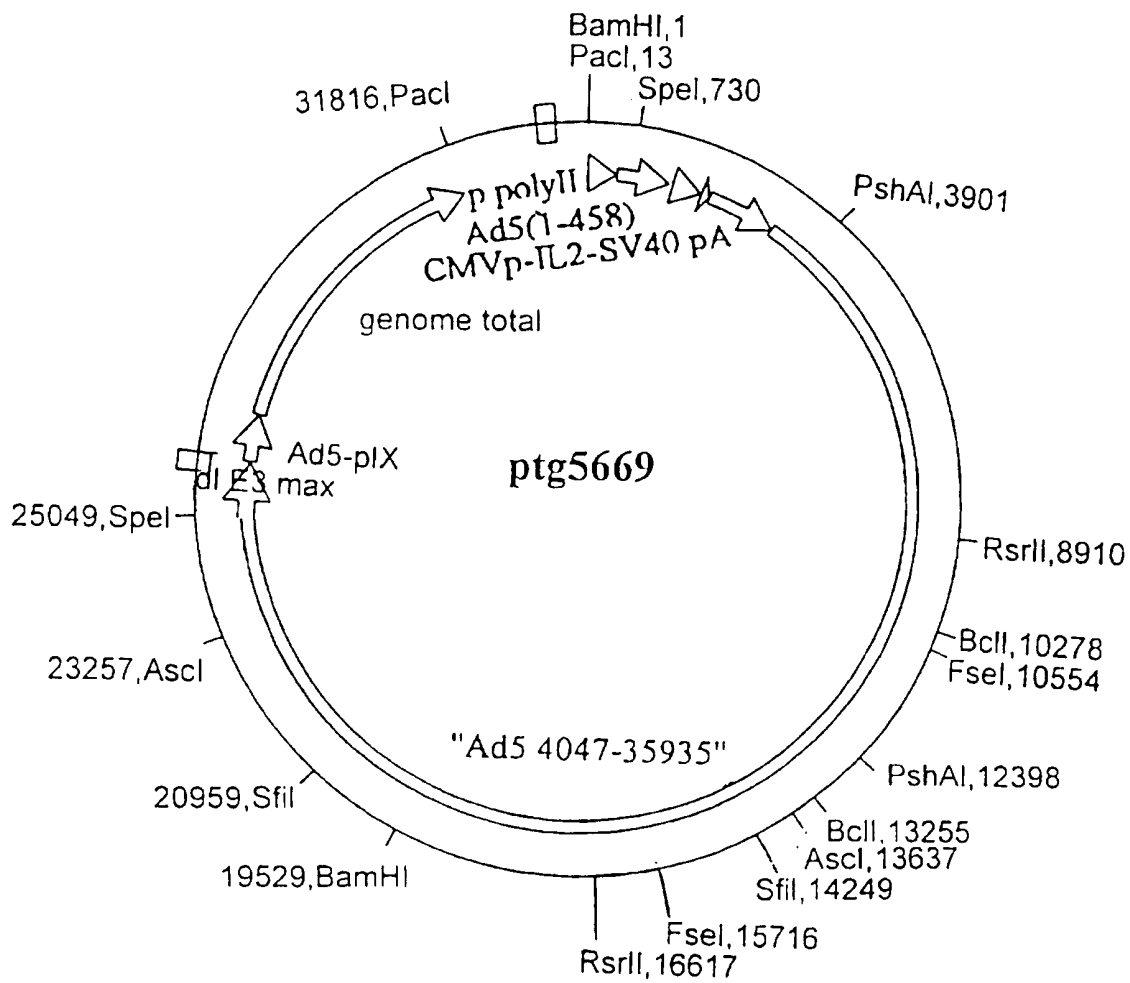


FIG. 7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00882

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 13596 A (RHONE POULENC RORER SA) 9 May 1996 see page 4, line 1-13 see page 9, line 13-21 see page 6, line 21-28 see page 14, line 1-32 see page 11, line 16-22 see page 12, line 1-11 - line 18-24 ---	1-17
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 91, 1 September 1994, US, pages 8802-8806, XP002011773 A.J. BETT ET AL.: "An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3" see the whole document --- -/-	1,6-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 September 1997

Date of mailing of the international search report

19.09.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 97/00882

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 16048 A (UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN) 15 June 1995 see abstract see page 8, line 28-39 ---	1-5,7,8, 10,11
A	WO 93 03769 A (THE UNITED STATES OF AMERICA) 4 March 1993 see page 6, line 24-30 see page 7, line 26 - page 10, line 10 ---	10,11,17
A	E.J. MURRAY (ED.): "Methods in Molecular Biology, Vol. 7: Gene transfer and expression protocols, pages 109-127" 1991, THE HUMANA PRESS INC., NEW JERSEY, US XP000196738 cited in the application see page 109 - page 114 ---	1-4
A	GENE THERAPY, vol. 2, 22 August 1995, LONDON, GB, pages 775-783, XP000196633 Q. WANG ET AL.: "A packaging cell line for propagation of recombinant adenovirus vectors containing two lethal gene-region deletions" cited in the application see the whole document ---	14
A	HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, 1 December 1995, NEW YORK, US, pages 1575-1586, XP000575816 V. KROUGLIAK AND F. GRAHAM: "Development of cell lines capable of complementing E1, E4, and protein IX defective adenovirus type 5 mutants" cited in the application see the whole document -----	1-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Appl. No.

PCT/FR 97/00882

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9613596 A	09-05-96	FR 2726285 A	03-05-96
		AU 3847795 A	23-05-96
		EP 0787199 A	06-08-97
		FI 971783 A	25-04-97
		NO 971764 A	17-04-97
		ZA 9509086 A	16-07-96
-----			
WO 9516048 A	15-06-95	AU 1189195 A	27-06-95
		EP 0736100 A	09-10-96
-----			
WO 9303769 A	04-03-93	AU 663725 B	19-10-95
		AU 2500692 A	16-03-93
		CA 2115742 A	04-03-93
		EP 0648271 A	19-04-95
		JP 6510665 T	01-12-94
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale No

PCT/FR 97/00882

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 13596 A (RHONE POULENC RORER SA) 9 Mai 1996 voir page 4, ligne 1-13 voir page 9, ligne 13-21 voir page 6, ligne 21-28 voir page 14, ligne 1-32 voir page 11, ligne 16-22 voir page 12, ligne 1-11 - ligne 18-24 ---	1-17
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 91, 1 Septembre 1994, US, pages 8802-8806, XP002011773 A.J. BETT ET AL.: "An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3" voir le document en entier --- -/-	1,6-8

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 Septembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19.09.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mateo Rosell, A.M.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 97/00882

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 16048 A (UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN) 15 Juin 1995 voir abrégé voir page 8, ligne 28-39 ---	1-5,7,8, 10,11
A	WO 93 03769 A (THE UNITED STATES OF AMERICA) 4 Mars 1993 voir page 6, ligne 24-30 voir page 7, ligne 26 - page 10, ligne 10 ---	10,11,17
A	E.J. MURRAY (ED.): "Methods in Molecular Biology, Vol. 7: Gene transfer and expression protocols, pages 109-127" 1991, THE HUMANA PRESS INC., NEW JERSEY, US XP000196738 cité dans la demande voir page 109 - page 114 ---	1-4
A	GENE THERAPY, vol. 2, 22 Août 1995, LONDON, GB, pages 775-783, XP000196633 Q. WANG ET AL.: "A packaging cell line for propagation of recombinant adenovirus vectors containing two lethal gene-region deletions" cité dans la demande voir le document en entier ---	14
A	HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, 1 Décembre 1995, NEW YORK, US, pages 1575-1586, XP000575816 V. KROUGLIAK AND F. GRAHAM: "Development of cell lines capable of complementing E1, E4, and protein IX defective adenovirus type 5 mutants" cité dans la demande voir le document en entier -----	1-8

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 97/00882

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9613596 A	09-05-96	FR 2726285 A	03-05-96
		AU 3847795 A	23-05-96
		EP 0787199 A	06-08-97
		FI 971783 A	25-04-97
		NO 971764 A	17-04-97
		ZA 9509086 A	16-07-96
-----			
WO 9516048 A	15-06-95	AU 1189195 A	27-06-95
		EP 0736100 A	09-10-96
-----			
WO 9303769 A	04-03-93	AU 663725 B	19-10-95
		AU 2500692 A	16-03-93
		CA 2115742 A	04-03-93
		EP 0648271 A	19-04-95
		JP 6510665 T	01-12-94
-----			